

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No. 2-242692

Date of Laid-Open: September 27, 1990

Application No. 1-64497

Filing date: March 16, 1989

Applicant: Kao Corporation

Inventors: Katsumi Kita et al.

Title of the Invention:

A method for producing a glycoside

Claims:

1. A method for producing a glycoside comprising enzymatically reacting a saccharide with an alcohol by using an amphiphilic compound as a solvent.
2. The method of claim 1, wherein the amphiphilic compound is a polyalkylene glycol or a polyalkylene glycol derivative.
3. The method of claim 2, wherein the amphiphilic compound is polyethylene glycol or a polyethylene glycol derivative.
4. The method of claim 1, wherein the amphiphilic compound is used in the form of a mixture with water or an organic solvent.

Page 3, lower right column, line 4 to page 4, upper left column, line 6

There is no limitation of the saccharide used in the method of the present invention if the saccharides can be a substrate of an enzyme to be used.

Examples include the followings: a monosaccharide such as glucose, galactose, fructose, mannose, ribose, arabinose, N-acetylglucosamine, glucosamine, glucuronic acid; a disaccharide such as maltose, cellobiose, sucrose, lactose; an oligosaccharide such as maltooligosaccharide, celooligosaccharide, cyclodextrin; a polysaccharide such as soluble starch, dextran, pullulan; and a saccharide derivative such as methylglucoside, ethylglucoside, phenylglucoside, methylfructoside, ethylfructoside, methylmaltoside, carboxymethylglucose, carboxymethylcellulose. In the present invention, two or more saccharides may be used in combination.

Page 5, upper left column, line 11 to upper right column, line 14

There is no limitation of the enzyme used in the method of the present invention if the enzymes can catalyze the reaction of a saccharide with an alcohol. Examples include the following glycolytic enzymes: α -amylase, β -amylase, glucoamylase, isoamylase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -mannosidase, β -mannosidase, β -fructosidase, cellulase, dextranase, exo-1,3- β -glucosidase, exo-1,4- β -glucosidase, β -N-acetylhexosaminase, α -N-acetylhexosaminase, α -L-fucosidase, β -fucosidase, pullulanase, α -L-rhamnosidase, β -glucuronidase, chitinase, lysozyme, and inulinase. According to the saccharide and the alcohol to be used, the enzyme can be selected adequately.

Page 6, upper left column, line 12 to upper right column, line 14

Example 1

Methyl- β -D-glucoside 194 mg (1 mmol) was placed into 100 ml volume of conical flask, and dissolved by adding 10 ml of 0.5M acetate buffer (pH 4.5). Then, 50 ml of polyethylene glycol (average molecular weight 400) was mixed therewith, and then 8 g of octanol (52 mmol) was mixed to make the reaction mixture. The conical flask containing the reaction mixture was placed into

the incubator at 40°C. After the temperature of the reaction mixture was reached to 40°C, 100 μ l of 0.3% cellulase solution (*Trichoderma viride*, manufactured by Seikagakukogyo) was added to the reaction mixture, and allowed to react at 40°C for 20 hours with stirring. After the reaction was stopped, octylglucoside was analyzed by HPLC to demonstrate that 102 mg of octylglucoside was produced (reaction yield 34.9%).

Page 6, lower right column, line 1 to page 7, upper right column, line 13

Example 2

Octylglucoside was synthesized as the same method and conditions as that of Example 1, except that 50 ml of polyethylene glycol monomethyl ether (average molecular weight 350) was used in place of 50 ml of polyethylene glycol (average molecular weight 400). As a result, octylglucoside was obtained in 31.2% of reaction yield.

Example 3

Octylglucoside was synthesized as the same method and conditions as that of Example 1, except that 50 ml of polyethylene glycol (average molecular weight 600) was used in place of 50 ml of polyethylene glycol (average molecular weight 400). As a result, octylglucoside was obtained in 29.3% of reaction yield.

Example 4

Octylglucoside was synthesized as the same method and conditions as that of Example 1, except that 50 ml of polyethylene glycol diacetate (average molecular weight 450) was used in place of 50 ml of polyethylene glycol (average molecular weight 400). As a result, octylglucoside was obtained in 21.5% of reaction yield.

Example 5

Sucrose 5 g (14.6 mmol) was placed into 100 ml volume of conical flask, and dissolved by adding 10 ml of 0.5M acetate buffer (pH 3.5). Then, 50 ml of polyethylene glycol (average molecular weight 400) which was previously dissolved with 15 % of butanol (butanol 0.1 mol) was mixed therewith to make the reaction mixture. The conical flask containing the reaction mixture was placed into the incubator at 50°C. After the temperature of the reaction mixture was reached to 50°C, 200 μ l of 0.3% β -fructofuranosidase solution (Bakers Yeast, manufactured by Seikagakukogyo) was added to the reaction mixture, and allowed to react at 50°C for 24 hours with stirring. After the reaction was stopped, butylfructoside was analyzed by HPLC to demonstrate that 87.5 mg of butylfructoside was produced (reaction yield 35.1%).

⑫ 公開特許公報(A)

平2-242692

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月27日

C 12 P 19/44
// C 07 H 15/04

A

8214-4B
7822-4C

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全7頁)

⑮ 発明の名称 配糖体の製造法

⑯ 特 願 平1-64497

⑰ 出 願 平1(1989)3月16日

⑱ 発 明 者	喜 多	克 己	大阪府泉佐野市長滝1655
⑱ 発 明 者	茅 根	滋 人	和歌山県和歌山市西浜1450
⑱ 発 明 者	上 野	朝 子	和歌山県和歌山市高松1-5-28
⑱ 発 明 者	黒 崎	富 裕	大阪府泉南郡岬町炭輪1465
⑲ 出 願 人	花 王 株 式 会 社		東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
⑳ 代 理 人	弁理士 有 賀 三 幸		外 2 名

明 細 書

製造法。

1. 発明の名称

配糖体の製造法

2. 特許請求の範囲

1. 糖類とアルコール類を、これらに対する両親媒性化合物を溶媒として酵素反応させることを特徴とする配糖体の製造法。

2. 両親媒性化合物がポリアルキレングリコールもしくはポリアルキレングリコール誘導体である請求項1記載の配糖体の製造法。

3. 両親媒性化合物がポリエチレングリコールもしくはポリエチレングリコール誘導体である請求項2記載の配糖体の製造法。

4. 両親媒性化合物を水もしくは有機溶媒との混合物として用いる請求項1記載の配糖体の

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、トイレットリー、化粧品等の基剤、乳化剤などとして、さらには医薬、食品などとして有用な配糖体を酵素反応を利用して効率よく製造する方法に関する。

〔従来の技術及びその課題〕

従来、糖類とアルコール類との酵素反応により種々の配糖体が製造されている。

例えば、グルコースとアルコールとをβ-グルコシダーゼを用いて水溶液中で反応させることによりアルキルグルコシドを合成する方法〔Enzymologia, 1, 129(1938)〕、メチルグルコシドやフェニルグルコシドなどの

グルコシド類とアルコールとをグルコシダーゼを用いて反応させ、アルコールへのグリコシル基の転移によりアルキルグルコシドを合成する方法(J. Biol. Chem., 232, 395 (1958)、Carbohydrate Res., 1, 419 (1966))、マルトースやシユクロースなどの少糖類とアルコールとをα-アミラーゼやインペルターゼなどを用いて反応させ、アルコールへのグリコシル基の転移によりアルキルグリコシドを合成する方法(例えば Biochemistry, 9, 1833, (1970)、Biochem. J., 50, 18(1952))などが知られている。しかし、これらの方法では、水への溶解度が小さいかあるいは殆ど溶解しないアルコール類、例えば炭素数4以上のアルコールなど

で、例えば水にアセトンなどの水溶性有機溶媒を添加して水難溶性アルコール類の水溶液への溶解度を高めることが試みられている。しかし、この方法は高級脂肪族アルコールなど水に殆ど溶けないアルコール類の場合には反応に十分な溶解度が得られ難く、またこれらを十分溶解させるために有機溶媒含量を高めると、糖類が不溶化したり、酵素の活性が低下あるいは失活するなどの問題が生じ、かならずしも満足のいくものではなかつた。

一方、有機溶媒中で酵素を失活させることなく酵素反応を行わせる方法として、酵素に疎水性化合物もしくは両親媒性化合物を化学反応により結合して酵素を有機溶媒に可溶かつ安定なものとした後、脂溶性基質を含む有

と糖類とを反応させた場合に、得られる配糖体の収率が極端に低下したり、あるいは殆ど反応が進行しないという欠点があつた。これは、用いた酵素の基質特異性によることの他に、基質であるアルコール類が糖と酵素を溶解した反応の場である水溶液に殆ど溶解しないため、反応系が不均一となつて、実際に反応に参与し得る実効アルコール類濃度が非常に低くなるため、アルコール類へのグリコシル基の転移反応よりも溶媒である水へのグリコシル基の転移反応、即ち加水分解反応が優先して進行したり、あるいは生成した該グリコシドがすみやかに加水分解するためであると考えられている。

そこで、この欠点を解決する目的でこれま

有機溶媒中で酵素反応を行う方法が知られている(例えば特開昭62-96084号、特開昭60-156395号)。しかしこれらの方法は糖類の如き水溶性化合物と高級アルコールの如き水難溶性化合物との酵素反応に適用した場合には、糖類が有機溶媒に実際上不溶であることから反応は殆ど進行しないという問題を有する。また、使用する酵素によつては、該酵素に化学反応によつて疎水性化合物もしくは両親媒性化合物を結合させ有機溶媒可溶とする際に酵素の活性の低下もしくは失活を引き起こす場合があり、使用しうる酵素が制限されるという問題があつた。

そこで、上記の如き問題点を克服し、糖類と水難溶性アルコールとの酵素反応が容易に

進行し、かつ高収率で配糖体を製造できる方法の開発が望まれていた。

〔課題を解決するための手段〕

斯かる実状において本発明者らは鋭意検討した結果、溶媒として糖類とアルコール双方に対して両親媒性のものを使用すれば、容易に酵素反応で配糖体を製造することが出来ることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は糖類とアルコール類を、これらに対する両親媒性化合物を溶媒として酵素反応させることを特徴とする配糖体の製造法を提供するものである。

本発明製造法における両親媒性化合物は、基質となる糖類とアルコール類の両方を溶解し、しかも使用する酵素の失活を實際上引き

減度範囲において液体であるものが特に好ましいが、液体でないものであつても適当な有機溶媒や水等を添加することで液体となるものであれば用いることが出来る。就中、室温で液体である分子量170以上600以下のポリエチレングリコールもしくはポリエチレングリコール誘導体は工業的に容易に取得するので、本発明の方法において用いる両親媒性化合物として有用である。

これらの両親媒性化合物はその他の両親媒性化合物と混合して用いてもよいし、あるいは他の有機溶媒や水もしくは緩衝液等の塩水溶液と混合して用いてもよい。

両親媒性化合物の使用量は、糖類とアルコール類を溶解するに十分な量であればとくに

起こさないものであれば特に限定されなく、好ましいものとして、例えばモノエチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール；ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール；ポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコールジメチルエーテルなどのポリエチレングリコールアルキルエーテル、ポリエチレングリコールジアセテートなどのポリエチレングリコールエステル等に代表されるポリアルキレングリコール誘導体などが挙げられ、更に芳香族アルコール、糖アルコールなどのエチレンオキサイド付加物；ポリエチレンポリプロピレン共重合化合物なども挙げられる。これらのうち、酵素反応に好ましい

限定されないが、通常アルコール類に対して0.1～500倍量、特に1～100倍量であることが好ましい。

本発明製造法において用いられる糖類としては、用いる酵素の基質となるものであればとくに限定されなく、例えば、グルコース、ガラクトース、フラクトース、マンノース、リボース、アラビノース、N-アセチルグルコサミン、グルコサミン、グルクロン酸などの単糖類；マルトース、セロビオース、シュクロース、ラクトースなどの二糖類；マルトオリゴ糖、セロオリゴ糖、シクロデキストリンなどのオリゴ糖；可溶性澱粉、デキストラン、プルランなどの多糖類；さらにはメチルグルコシド、エチルグルコシド、フェニルグ

ルコシド、メチルフルクトシド、エチルフルクトシド、メチルマルトシド、カルボキシメチルグルコース、カルボキシメチルセルロースなどの糖類の誘導体などが挙げられる。また、本発明ではこれらの糖類を二種類以上組み合わせて用いることもできる。

これらの糖類の両親媒性化合物への溶解法は、通常、糖類の水溶液もしくは糖類の緩衝溶液を両親媒性化合物に添加して溶解することにより行われるが、場合によつては両親媒性化合物に糖類を添加後、適当量の水と緩衝液あるいは水と緩衝液と有機溶媒との混合溶液を添加することにより溶解させることもできる。また他の有機溶媒と水もしくは緩衝液との混合溶液に溶解させた後、両親媒性化

合物に添加して溶解したり、また場合によつてはそのまま両親媒性化合物に添加して溶解することもできる。糖類の両親媒性化合物に対する使用量は、両親媒性化合物への溶解度を越えない範囲であることが好ましく、通常両親媒性化合物に対して0.01～20重量%、特に0.5～5重量%であることが好ましい。なお、糖類の溶解度を越える添加による糖類の両親媒性化合物からの析出は、本発明の方法を実施する上で実際上妨げにならない。

本発明製造法で用いられるアルコール類としては、使用する酵素の基質となるものであればとくに限定されなく、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、

ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、テトラデカノール、ペンタデカノール、ヘキサデカノール、ヘプタデカノール、オクタデカノール、イソオクタデカノール、ヘキセノール、オクタノール、デセノール、ドデセノール、ヘキサデセノール、オクタデセノール、シクロヘキサノールなどの脂肪族アルコール；脂肪族アルコールのアミノ置換体、ハロゲン置換体など；グラニオール、シトロネロール、メントール、ファルネソールなどのテルペンアルコール；コレステロール、コール酸などのステロール類；フェノール、パラヒドロキシトルエン、ハイドロキノン、パラメトキシフェノール、パ

ラターシヤリイブチルフエノール、パラヘキシルフェノール、パラドデカニルフエノール、パラヒドロキシ安息香酸、サリチル酸メチル、バニリン、パラヒドロキシケイ皮酸、オイゲノール、パラアミノフェノール、パラニトロフェノール、カタコール、ドーパ、ドーパミン、エピネフリンなどの芳香族アルコール；アスコルビン酸、ピリドキシン、レチノール、リボフラビン、トコフェロールなどのビタミン類；スレオニン、チロシンなどのアミノ酸類などが挙げられる。これらのアルコール類と糖類との混合方法は特に限定されないが、例えば、本発明の両親媒性化合物と糖類の混合物に、アルコール類をそのまま添加、混合するか、あるいは本発明の両親媒性化

物もしくは他の有機溶媒にアルコール類を溶解したものを添加、混合する方法が用いられる。本発明の方法で用いられるアルコール類の使用量はとくに限定されないが、本発明で用いる酵素を失活させたり、あるいは本発明で用いる両親媒性化合物への糖類の溶解度を著しく低下させない範囲で用いることが好ましく、通常両親媒性化合物に対して0.2～1000重量%、特に1～100重量%であることが好ましい。

本発明製造法で用いる酵素は、本発明の糖類とアルコール類との反応を触媒するものであれば特に限定されなく、例えば α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -

グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -マンノシダーゼ、 β -マンノシダーゼ、 β -フルクトフラノシダーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、エキソ-1,3- β -グルコシダーゼ、エキソ-1,4- β -グルコシダーゼ、 β -N-アセチルヘキシサミナーゼ、 α -N-アセチルグルコサミナーゼ、 α -L-フコシダーゼ、 β -フコシダーゼ、アルナラーゼ、 α -L-ラムノシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、キナーゼ、リゾチーム、イヌリナーゼなどの糖質分解酵素を挙げることができ、使用する糖類とアルコール類の種類により、それらを基質とする酵素を任意に選ぶことができる。また、本発明の方法で用いられる酵素は場合

によつてはイオン交換樹脂などの担体に固定化したり、高分子ゲルに包括したりあるいは化学修飾等を施したりして用いることもできる。本発明において使用される酵素の使用量は、糖類とアルコール類の反応が実用上十分な速度で進行するに足る量であれば特に限定はされない。本発明の方法において使用される酵素の添加方法は酵素の失活が起こらないものであれば特に限定されなく、例えば糖類とアルコール類とを溶解した両親媒性化合物溶液に、酵素を粉末のまま添加したり、あるいは酵素を水溶液として添加する方法や、酵素と糖類の混合物を、アルコール類と両親媒性化合物の混合溶液に添加する方法が用いられる。

本発明製造法における糖類とアルコール類の酵素による反応温度とpHは、用いる酵素が失活することなく実用上十分活性を示す温度およびpHであれば特に限定されないが、用いる酵素の至適温度および至適pHを選ぶことが特に好ましい。また、本発明の方法においては、反応pHは通常適当な緩衝液を用いることで設定することもできる。ここで用いられる緩衝液の種類と濃度は、酵素反応を著しく妨害するものでない限り特に限定されない。更に、本発明製造法における反応時間は、糖類とアルコール類との反応により生成する配糖体が実際上増加しなくなるまでとすることが好ましく、特に限定はされない。

〔発明の効果〕

本発明の配糖体の製造法は、従来困難であった脂溶性アルコール類と糖類との酵素反応を、両親媒性化合物を溶媒として用いることで、容易に効率よく行うことを可能にし、トイタリーもしくは化粧品用の添剤や乳化剤など、さらには医薬、食品などとして有用な配糖体の製造法として極めて有用である。

〔実施例〕

以下に実施例を挙げ、さらに本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

メチル-β-D-グルコシド 19.4 mg (1 mmol) を 100 ml 容の三角フラスコにとり、これに pH 4.5、0.5 M 酢酸緩衝液 10 ml を

メチル-β-D-グルコシド 19.4 mg (1 mmol) を 100 ml 容の三角フラスコにとり、これに pH 4.5、0.5 M 酢酸緩衝液 80 ml を加えてメチル-β-D-グルコシドを溶解した。これにオクタノール 8 g (82 mmol) を加えよく混合し反応液とした。反応液が入った三角フラスコを 40℃ に保った恒温槽に入れ、反応液の温度が 40℃ となつた後、セルラーゼ Onosuka R-10 (Trichoderma viride 生化学工業社製) の 0.3% 水溶液 100 μl を反応液に添加し、よく攪拌しながら 40℃ で 20 時間反応した。反応終了後 HPLC により、オクタナルグルコシドの分析をおこなつたところ、オクタナルグルコシドの生成はほとんど認められなかつた。

加えてメチル-β-D-グルコシドを溶解した。これにポリエチレングリコール (平均分子量 400) 50 ml を加えよく混合した後、さらにオクタノール 8 g (82 mmol) を加えよく混合し反応液とした。反応液が入った三角フラスコを 40℃ に保った恒温槽に入れ、反応液の温度が 40℃ となつた後、セルラーゼ Onosuka R-10 (Trichoderma viride 生化学工業社製) の 0.3% 水溶液 100 μl を反応液に添加し、静かに攪拌しながら 40℃ で 20 時間反応させた。反応終了後 HPLC によりオクタナルグルコシドの分析を行つたところ、オクタナルグルコシドが 10.2 mg 生成していた (反応収率 34.9%)。

比較例 1

実施例 2

実施例 1 においてポリエチレングリコール (平均分子量 400) 50 ml の代わりに、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル (平均分子量 350) 50 ml を用いた以外は、実施例 1 と同一の方法および条件でオクタナルグルコシドの合成を行つた。その結果、オクタナルグルコシドが反応収率 31.2% で得られた。

実施例 3

実施例 1 においてポリエチレングリコール (平均分子量 400) を 50 ml 使用する代わりに平均分子量 600 のポリエチレングリコールを 50 ml 使用する以外は実施例 1 と同一の方法および条件でオクタナルグルコシド

の合成をおこなった。その結果、オクタルグルコシドが反応収率29.3%で得られた。

実施例4

実施例1においてポリエチレングリコール(平均分子量400)を50ml使用する代わりにポリエチレングリコールジアセテート(平均分子量450)50mlを使用する以外は実施例1と同一の方法および条件でオクタルグルコシドの合成を行なった。その結果、オクタルグルコシドが反応収率21.5%で得られた。

実施例5

シクロロース5g(14.6mmol)を100ml容の三角フラスコにとり、これにpH3.5、1M酢酸緩衝液10mlを加えてシクロロース

を溶解した。これに予め15%のブタノールを溶解したポリエチレングリコール(平均分子量400)50ml(ブタノール0.1mol)を加えよく混合し反応液とした。反応液が入った三角フラスコを50℃に保った恒温槽に入れ、反応液の温度が50℃となつた後、 β -フルクトフラノシダーゼ(Bakers Yeast, 生化学工業社製)の0.3%水溶液200 μ lを反応液に添加し、しずかに攪拌しながら50℃で24時間反応させた。反応終了後HPLCによりブチルフルクトシドの分析を行なったところ、ブチルフルクトシドが87.5mg生成していた(反応収率35.1%)。

以上

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-242692

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月27日

C 12 P 19/44
// C 07 H 15/04

A 8214-4B
7822-4C

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全7頁)

⑮ 発明の名称 配糖体の製造法

⑯ 特 願 平1-64497

⑰ 出 願 平1(1989)3月16日

⑱ 発 明 者 喜 多 克 己 大阪府泉佐野市長滝1655
⑱ 発 明 者 茅 根 滋 人 和歌山県和歌山市西浜1450
⑱ 発 明 者 上 野 朝 子 和歌山県和歌山市高松1-5-28
⑱ 発 明 者 黒 崎 富 裕 大阪府泉南郡岬町淡輪1465
⑲ 出 願 人 花 王 株 式 会 社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
⑳ 代 理 人 弁 理 士 有 賀 三 幸 外2名

明 細 書

製造法。

1. 発明の名称

3. 発明の詳細な説明

配糖体の製造法

(産業上の利用分野)

2. 特許請求の範囲

本発明は、トイレットリー、化粧品等の薬剤、

1. 糖類とアルコール類を、これらに対する両
親媒性化合物を溶媒として酵素反応させるこ
とを特徴とする配糖体の製造法。

乳化剤などとして、さらには医薬、食品など
として有用な配糖体を酵素反応を利用して効
率よく製造する方法に関する。

2. 両親媒性化合物がポリアルキレングリコー
ルもしくはポリアルキレングリコール誘導体
である請求項1記載の配糖体の製造法。

(従来の技術及びその課題)

従来、糖類とアルコール類との酵素反応に
より種々の配糖体が製造されている。

3. 両親媒性化合物がポリエチレングリコール
もしくはポリエチレングリコール誘導体であ
る請求項2記載の配糖体の製造法。

例えば、グルコースとアルコールとをβ
-グルコシダーゼを用いて水溶液中で反応さ
せることによりアルキルグルコシドを合成す
る方法(Enzymologia, 1, 129(1936))、メ
チルグルコシドやフェニルグルコシドなどの

4. 両親媒性化合物を水もしくは有機溶媒との
混合物として用いる請求項1記載の配糖体の

グリコシド類とアルコールとをグリコシダーゼを用いて反応させ、アルコールへのグリコシル基の転移によりアルキルグリコシドを合成する方法 (J. Biol. Chem., 232, 395 (1958), Carbohydrate Res., 1, 418 (1968))、マルトースやシクロロースなどの少糖類とアルコールとを α -アミラーゼやインベルターゼなどを用いて反応させ、アルコールへのグリコシル基の転移によりアルキルグリコシドを合成する方法 (例えば Biochemistry, 9, 1833, (1970), Biochem. J., 50, 18 (1952)) などが知られている。しかし、これらの方法では、水への溶解度が小さいあるいは殆ど溶解しないアルコール類、例えば炭素数4以上のアルコールなど

で、例えば水にアセトンなどの水溶性有機溶媒を添加して水難溶性アルコール類の水溶液への溶解度を高めることが試みられている。しかし、この方法は高級脂肪族アルコールなど水に殆ど溶けないアルコール類の場合には反応に十分な溶解度が得られ難く、またこれらを十分溶解させるために有機溶媒含量を高めると、糖類が不溶化したり、酵素の活性が低下あるいは失活するなどの問題が生じ、かならずしも満足のいくものではなかつた。

一方、有機溶媒中で酵素を失活させることなく酵素反応を行わせる方法として、酵素に疎水性化合物もしくは両親媒性化合物を化学反応により結合して酵素を有機溶媒に可溶かつ安定なものとした後、脂溶性基質を含む有

と糖類とを反応させた場合に、得られる配糖体の収率が極端に低下したり、あるいは殆ど反応が進行しないという欠点があつた。これは、用いた酵素の基質特異性によることの他に、基質であるアルコール類が糖と酵素を溶解した反応の場である水溶液に殆ど溶解しないため、反応系が不均一となつて、実際に反応に参与し得る有効アルコール類濃度が非常に低くなるため、アルコール類へのグリコシル基の転移反応よりも溶媒である水へのグリコシル基の転移反応、即ち加水分解反応が優先して進行したり、あるいは生成した該グリコシドがすみやかに加水分解するためであると考えられている。

そこで、この欠点を解決する目的でこれま

有機溶媒中で酵素反応を行う方法が知られている (例えば特開昭62-96084号、特開昭60-156395号)。しかしこれらの方法は糖類の如き水溶性化合物と高級アルコールの如き水難溶性化合物との酵素反応に適用した場合には、糖類が有機溶媒に実際上不溶であることから反応は殆ど進行しないという問題を有する。また、使用する酵素によつては、該酵素に化学反応によつて疎水性化合物もしくは両親媒性化合物を結合させ有機溶媒可溶とする際に酵素の活性の低下もしくは失活を引き起こす場合があり、使用しうる酵素が制限されるという問題があつた。

そこで、上記の如き問題点を克服し、糖類と水難溶性アルコールとの酵素反応が容易に

進行し、かつ高収率で配糖体を製造できる方法の開発が望まれていた。

(課題を解決するための手段)

斯かる状況において本発明者らは鋭意検討した結果、溶媒として糖類とアルコール双方に対して両親水性のものを使用すれば、容易に酵素反応で配糖体を製造することが出来ることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は糖類とアルコール類を、これらに対する両親水性化合物を溶媒として酵素反応させることを特徴とする配糖体の製造法を提供するものである。

本発明製造法における両親水性化合物は、基質となる糖類とアルコール類の両方を溶解し、しかも使用する酵素の失活を實際上引き

置度範囲において液体であるものが特に好ましいが、液体でないものであつても適当な有機溶媒や水等を添加することで液体となるものであれば用いることが出来る。就中、室温で液体である分子量170以上600以下のポリエチレングリコールもしくはポリエチレングリコール誘導体は工業的に容易に取得しうるので、本発明の方法において用いる両親水性化合物として有用である。

これらの両親水性化合物はその他の両親水性化合物と混合して用いてもよいし、あるいは他の有機溶媒や水もしくは緩衝液等の塩水溶液と混合して用いてもよい。

両親水性化合物の使用量は、糖類とアルコール類を溶解するに十分な量であればとくに

起こさないものであれば特に限定されなく、好ましいものとして、例えばモノエチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール；ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール；ポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコールジメチルエーテルなどのポリエチレングリコールアルキルエーテル、ポリエチレングリコールジアセテートなどのポリエチレングリコールエステル等にて代表されるポリアルキレングリコール誘導体などが挙げられ、更に芳香族アルコール、糖アルコールなどのエチレンオキサイド付加物；ポリエチレンポリプロピレン共重合化合物なども挙げられる。これらのうち、酵素反応に好ましい

限定されないが、通常アルコール類に対して0.1～500倍量、特に1～100倍量であることが好ましい。

本発明製造法において用いられる糖類としては、用いる酵素の基質となるものであればとくに限定されなく、例えば、グルコース、ガラクトース、フラクトース、マンノース、リボース、アラビノース、N-アセチルグルコサミン、グルコサミン、グルクロン酸などの単糖類；マルトース、セロビオース、シュクロース、ラクトースなどの二糖類；マルトオリゴ糖、セロオリゴ糖、シクロデキストリンなどのオリゴ糖；可溶性澱粉、デキストラン、プルランなどの多糖類；さらにはメチルグルコシド、エチルグルコシド、フェニルグ

ルコシド、メチルフルクトシド、エチルフルクトシド、メチルマルトシド、カルボキシメチルグルコース、カルボキシメチルセルロースなどの糖類の誘導体などが挙げられる。また、本発明ではこれらの糖類を二種類以上組み合わせることもできる。

これらの糖類の両親媒性化合物への溶解法は、通常、糖類の水溶液もしくは糖類の緩衝液を両親媒性化合物に添加して溶解することにより行われるが、場合によつては両親媒性化合物に糖類を添加後、適量の水と緩衝液あるいは水と緩衝液と有機溶媒との混合液を添加することにより溶解させることもできる。また他の有機溶媒と水もしくは緩衝液との混合液に溶解させた後、両親媒性化

合物に添加して溶解したり、また場合によつてはそのまま両親媒性化合物に添加して溶解することもできる。糖類の両親媒性化合物に対する使用量は、両親媒性化合物への溶解度を越えない範囲であることが好ましく、通常両親媒性化合物に対して0.01～20重量%、特に0.5～5重量%であることが好ましい。なお、糖類の溶解度を越える添加による糖類の両親媒性化合物からの析出は、本発明の方法を実施する上で実用上妨げにならない。

本発明製造法で用いられるアルコール類としては、使用する酵素の高質となるものであればとくに限定されなく、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノー

ル、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、テトラデカノール、ペンタデカノール、ヘキサデカノール、ヘプタデカノール、オクタデカノール、イソオクタデカノール、ヘキセノール、オクタノール、デセノール、ドデセノール、ヘキサデセノール、オクタデセノール、シクロヘキサノールなどの脂肪族アルコール；脂肪族アルコールのアミノ置換体、ハロゲン置換体など；グラニオール、シトロネロール、メントール、ファルネソールなどのテルペンアルコール；コレステロール、コール酸などのステロール類；フェノール、パラヒドロキシトルエン、ハイドロキノン、パラメトキシフェノール、ペ

ラターシャリイブチルフェノール、パラヘキシルフェノール、パラドデカニルフェノール、パラヒドロキシ安息香酸、サリチル酸メチル、バエリン、パラヒドロキシケイ皮酸、オイゲノール、パラアミノフェノール、パラエトロフェノール、カチコール、ドーパ、ドーパミン、エピネフリンなどの芳香族アルコール；アスコルビン酸、ピリドキシン、レチノール、リボフラビン、トコフェロールなどのビタミン類；スレオエン、チロシンなどのアミノ酸類などが挙げられる。これらのアルコール類と糖類との混合方法は特に限定されないが、例えば、本発明の両親媒性化合物と糖類の混合物に、アルコール類をそのまま添加、混合するか、あるいは本発明の両親媒性化

物もしくは他の有機溶媒にアルコール類を溶解したものゝ添加、混合する方法が用いられる。本発明の方法で用いられるアルコール類の使用量はとくに限定されないが、本発明で用いる酵素を失活させたり、あるいは本発明で用いる両親媒性化合物への糖類の溶解度を著しく低下させない範囲で用いることが好ましく、通常両親媒性化合物に対して0.2～1000重量%、特に1～100重量%であることが好ましい。

本発明製造法で用いる酵素は、本発明の糖類とアルコール類との反応を触媒するものであれば特に限定されなく、例えば α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -

グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -マンノシダーゼ、 β -マンノシダーゼ、 β -フルクトフラノシダーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、エキソ-1,3- β -グルコシダーゼ、エキソ-1,4- β -グルコシダーゼ、 β -N-アセチルヘキサミンナーゼ、 α -N-アセチルグルコサミンナーゼ、 α -L-フコシダーゼ、 β -フコシダーゼ、アルナラーゼ、 α -L-ラムノシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、キナーゼ、リゾチーム、イヌリナーゼなどの糖質分解酵素を挙げることができ、使用する糖類とアルコール類の種類により、それらを基質とする酵素を任意に選ぶことができる。また、本発明の方法で用いられる酵素は場合

によつてはイオン交換樹脂などの担体に固定化したり、高分子ゲルに包括したりあるいは化学修飾等を行したりして用いることもできる。本発明において使用される酵素の使用量は、糖類とアルコール類の反応が実用上十分な速度で進行するに足る量であれば特に限定はされない。本発明の方法において使用される酵素の添加方法は酵素の失活が起こらないものであれば特に限定されなく、例えば糖類とアルコール類とを溶解した両親媒性化合物溶液に、酵素を粉末のまま添加したり、あるいは酵素を水溶液として添加する方法や、酵素と糖類の混合物を、アルコール類と両親媒性化合物の混合溶液に添加する方法が用いられる。

本発明製造法における糖類とアルコール類の酵素による反応温度とpHは、用いる酵素が失活することなく実用上十分活性を示す温度およびpHであれば特に限定されないが、用いる酵素の最適温度および最適pHを選ぶことが特に好ましい。また、本発明の方法においては、反応pHは通常適当な緩衝液を用いることで設定することもできる。ここで用いられる緩衝液の種類と濃度は、酵素反応を著しく妨害するものでない限り特に限定されない。更に、本発明製造法における反応時間は、糖類とアルコール類との反応により生成する配糖体が増加しなくなるまでとすることが好ましく、特に限定はされない。

〔発明の効果〕

本発明の配糖体の製造法は、従来困難であつた脂溶性アルコール類と糖類との酵素反応を、両親媒性化合物を溶媒として用いることで、容易に効率よく行うことを可能にし、トイタリーもしくは化粧品用の基剤や乳化剤など、さらには医薬、食品などとして有用な配糖体の製造法として極めて有用である。

(実施例)

以下に実施例を挙げ、さらに本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

メチル- β -D-グルコシド 1.84 g (1 mmol) を 100 ml 容の三角フラスコにとり、これに pH 4.5, 0.5 M 酢酸緩衝液 10 ml を

メチル- β -D-グルコシド 1.84 g (1 mmol) を 100 ml 容の三角フラスコにとり、これに pH 4.5, 0.5 M 酢酸緩衝液 50 ml を加えてメチル- β -D-グルコシドを溶解した。これにオクタノール 8 g (82 mmol) を加えよく混合し反応液とした。反応液が入つた三角フラスコを 40℃ に保つた恒温槽に入れ、反応液の温度が 40℃ となつた後、セルラーゼ Onozuka R-10 (Trichoderma viride 生化学工業社製) の 0.3% 水溶液 100 μ l を反応液に添加し、よく攪拌しながら 40℃ で 20 時間反応した。反応終了後 HPLC により、オクタグルコシドの分析をおこなつたところ、オクタグルコシドの生成はほとんど認められなかつた。

加えてメチル- β -D-グルコシドを溶解した。これにポリエチレングリコール (平均分子量 400) 50 ml を加えよく混合した後、さらにオクタノール 8 g (82 mmol) を加えよく混合し反応液とした。反応液が入つた三角フラスコを 40℃ に保つた恒温槽に入れ、反応液の温度が 40℃ となつた後、セルラーゼ Onozuka R-10 (Trichoderma viride 生化学工業社製) の 0.3% 水溶液 100 μ l を反応液に添加し、静かに攪拌しながら 40℃ で 20 時間反応させた。反応終了後 HPLC によりオクタグルコシドの分析を行つたところ、オクタグルコシドが 102 mg 生成していた (反応収率 34.8%)。

比較例 1

実施例 2

実施例 1 に於いてポリエチレングリコール (平均分子量 400) 50 ml の代わりに、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル (平均分子量 350) 50 ml を用いた以外は、実施例 1 と同一の方法および条件でオクタグルコシドの合成を行つた。その結果、オクタグルコシドが反応収率 31.2% で得られた。

実施例 3

実施例 1 に於いてポリエチレングリコール (平均分子量 400) を 50 ml 使用する代わりに平均分子量 800 のポリエチレングリコールを 50 ml 使用する以外は実施例 1 と同一の方法および条件でオクタグルコシド

の合成をおこなった。その結果、オクタグルコシドが反応収率28.3%で得られた。

実施例4

実施例1においてポリエチレングリコール(平均分子量400)を50ml使用する代わりにポリエチレングリコールジアセテート(平均分子量480)50mlを使用する以外は実施例1と同一の方法および条件でオクタグルコシドの合成を行なった。その結果、オクタグルコシドが反応収率21.5%で得られた。

実施例5

シユクロース5g(14.8mmol)を100ml容の三角フラスコにとり、これにpH3.5, 1M酢酸緩衝液10mlを加えてシユクロース

を溶解した。これに予め15%のブタノールを溶解したポリエチレングリコール(平均分子量400)50ml(ブタノール0.1mol)を加えよく混合し反応液とした。反応液が入った三角フラスコを50℃に保った恒温槽に入れ、反応液の温度が50℃となつた後、 β -フルクトフラノシダーゼ(Bakers Yeast, 生化学工業社製)の0.3%水溶液200 μ lを反応液に添加し、しずかに攪拌しながら50℃で24時間反応させた。反応終了後HPLCによりブチルフルクトシドの分析を行なったところ、ブチルフルクトシドが87.5 μ mol生成していた(反応収率35.1%)。

以上